



Uniwersytet Warszawski
Wydział Biologii

Julia Kozłowska

Nr albumu: 367359

Ocena aktywności immunologicznej mózgu
u myszy zarażonych
Heligmosomoides polygyrus bakeri

Praca magisterska
na kierunku Biologia
w zakresie Biologii Komórki i Organizmu

Praca wykonana pod kierunkiem
prof. Marii Doligalskiej
Instytut Zoologii
Zakład Parazytologii

Warszawa, 07.2019

Oświadczenie kierującego pracą

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie tytułu zawodowego.

Data

Podpis kierującego pracą

Oświadczenie autora pracy

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza praca dyplomowa została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona praca nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem tytułu zawodowego w wyższej uczelni.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja pracy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data

Podpis autora pracy

Streszczenie

Heligmosomoides polygyrus to nicień pasożytujący w jelicie cienkim myszy. Jest gatunkiem modelowym do badania właściwości immunomodulujących i immunosupresyjnych antygenów nicieni. Wiadomo już, że przewlekłe zarażenie nicieniem może opóźniać neurodegenerację przez wywoływanie supresyjnej odpowiedzi immunologicznej. Celem pracy było zbadanie wpływu zarażenia *H. polygyrus* na aktywność immunologiczną w mózgu wzbudzoną przez toksynę krztuśca u myszy w wieku starym. Sprawdzano, czy długotrwała inwazja pasożyta osłabia reakcję zapalną i czy zadziała neuroprotekcynie u myszy. W badaniu oceniano aktywność komórek układu odpornościowego w mózgu jednorocznych samców myszy C57BL/6 zarażonych *H. polygyrus*. Trzymiesięczne myszy zostały zarażone i obserwowane do czasu ustąpienia objawów zarażenia. Badanie wykonano gdy myszy były w wieku sześciu miesięcy i jednego roku, pięć dni po wzbudzeniu toksyną *Bordetella pertussis* (BpT) ogólnoustrojowego stanu zapalnego i porównywano z niezarażonymi myszami. Makrofagi z płynu mózgowo-rdzeniowego znakowano przeciwciałami monoklonalnymi anti-CD3 FITC, anti-CD11b PercP, anti-CD206 APC i anti-CD80 PE i analizowane za pomocą FACSVerse przy użyciu oprogramowania FACSDiva. Poziomy IL-6, IL-10, TGF- β i surwiwiny mierzono w supernatancie homogenatu mózgu przy użyciu testu ELISA.

Odpowiedź M2-makrofagów zmieniała się w zależności od wieku myszy po stymulacji BpT- wyłącznie u zwierząt zarażonych pasożytem. Populacja komórek zmniejszyła się z 20,3 do 5,9% u starych myszy i zwiększyła z 11,9% do 29,5% u myszy sześciomiesięcznych po stymulacji BpT. Poziom surwiwiny wzrósł po zarażeniu *H. polygyrus bakeri*, jednak opadł w reakcji na BpT. U sześciomiesięcznych myszy poziomy IL-6 i IL-10 zmniejszyły się po zarażeniu, lecz wzrosły po stymulacji odpowiedzi na BpT. Stężenie TGF- β wzrosło u zwierząt zarażonych *H. polygyrus*, zwłaszcza u myszy jednorocznych w odpowiedzi na podanie BpT.

Wczesne zarażenie nicieniami może wpływać na przebieg odpowiedzi immunologicznej w mózgu starych myszy. Potrzebne są dalsze szczegółowe badania, by określić rolę pasożytów w ochronie tkanki nerwowej przed stanem chorobowym wywołanym reakcjami immunologicznymi.

Słowa kluczowe

Heligmosomoides polygyrus, makrofagi, surwiwina, neurodegeneracja

Dziedzina pracy (kod wg programu Socrates-Erasmus)

13.1 Biologia

Tytuł w języku angielskim

Evaluation of brain immune activity in mice infected
with *Heligmosomoides polygyrus bakeri*

*Serdeczne podziękowania
dla prof. Marii Doligalskiej
za cierpliwość, wsparcie merytoryczne i cenne uwagi
oraz
dla Katarzyny Krawczak, Marty Maruszewskiej- Cheruiyot
i przede wszystkim Weroniki Polańskiej
za współpracę i wsparcie w laboratorium*

Spis treści

Strona tytułowa.....	1
Streszczenie.....	3
1. Wstęp	
1.1. Właściwości immunoregulacyjne pasożytów	6
1.2. Właściwości immunoregulacyjne <i>Heligmosomoides polygyrus bakeri</i>	8
1.3. Charakterystyka odpowiedzi immunologicznej u osobników starych....	10
1.4. Biologiczna rola surwiwiny.....	11
1.5. Funkcje cytokin: IL-6, IL-10, TGF- β	12
1.6. Schorzenia neurodegeneracyjne AD i ich podłoże.....	13
1.7. Toksyna krztuśca.....	15
1.8. Makrofagi M2.....	16
1.9. Cel pracy.....	18
1.10. Hipoteza badawcza.....	18
2. Materiały i metody	
2.1. Oświadczenie dotyczące etyki.....	19
2.2. Pasożyt i zwierzęta doświadczalne.....	19
2.3. Pozyskanie płynu mózgowo-rdzeniowego (CSF) i homogenatu mózgu.....	20
2.4. Barwienie makrofagów i analiza FACSVerse.....	20
2.5. Oznaczanie stężenia surwiwiny.....	21
2.6. Oznaczenie poziomu cytokin regulatorowych i prozapalnych.....	21
3. Wyniki	
3.1. Dane z sekcji- masa mózgu oraz liczba komórek w CSF.....	22
3.2. Analiza makrofagów przy użyciu FACSVerse.....	23
3.3. Poziom surwiwiny	24
3.4. Wartość OD dla cytokin: IL-6 i IL-10.....	25
3.5. Poziom TGF- β w CSF myszy.....	26
4. Dyskusja.....	26
5. Bibliografia.....	30

1. Wstęp

1.1. Właściwości immunoregulacyjne pasożytów

Wiele danych epidemiologicznych potwierdza, że zarażenie nicieniami może zapewnić pewną ochronę przed chorobami alergicznymi, autoimmunologicznymi oraz neurodegeneracyjnymi. W związku z tym pojawia się koncepcja, że nicienie silnie wpływają na układ odpornościowy i wzbudzają ochronne szlaki przeciw chorobom związanym z hiperimmunizacją ¹.

Wiele gatunków pasożytów, w tym nicieni jelitowych, wzbudza mechanizmy regulatorowe podczas zarażenia. Każdy z nich wykorzystuje swoiste dla siebie antygeny, dlatego czas pojawienia się immunoregulacji związany jest z migracją pasożyta przez tkanki żywiciela lub z osiedleniem się w docelowym narządzie. Jelito jest tym narządem w którym najłatwiej można stwierdzić efekt pasożytniczej immunoregulacji, jednak uważa się że mechanizmy hamujące mogą być ogólnoustrojowe. Jednym z nicieni, mających działanie immunoregulacyjne jest *Trichinella spiralis*. Wyniki eksperymentalne pokazały, że zarażenie *Trichinella spp.* może złagodzić niektóre choroby jak np. alergiczne ², i choroby autoimmunizacyjne, na przykład chorobę Leśniowskiego-Crohna ³, wrzodziejące zapalenia jelita grubego ⁴, cukrzycę typu 1 ⁵, autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia ⁶. Interpretacja większości wyników tych badań uwzględnia indukowaną odpowiedź immunologiczną Th2. Wzmacnianie odpowiedzi immunologicznej Th2 przez większość pasożytów podczas blokowania odpowiedzi Th1 sugeruje osłabienie Th1- postępujące reakcje zapalne w żywicielu ^{7,8}. Jednak niektóre z tych stanów zapalnych, łagodzonych przez *T. spiralis* charakteryzują się zwiększoną odpowiedzią Th2. Wyniki te sugerują, że modulacja odpowiedzi immunologicznej wywołanej zarażeniem pasożytami jelitowymi, może być

bardziej złożona niż tylko pojawienie się dominującej odpowiedzi typu 2. Taka koncepcja podkreśla możliwą rolę innych mechanizmów, dzięki którym zarażenia pasożytnicze wzbudzają regulatorową odpowiedź immunologiczną żywiciela, z udziałem takich komórek jak na przykład, indukowane T_{reg} , komórki B regulatorowe (B_{reg}) czy makrofagi aktywowane na drodze alternatywnej (AAM).

Helminy mogą obniżyć poziom odpowiedzi immunologicznej poprzez indukcję odpowiedzi komórek Treg lub po wzbudzeniu produkcji cytokin przeciwzapalnych, takich jak IL-10 oraz TGF- β . TGF- β może regulować odpowiedź Th1 i Th2⁹. Efekt immunomodulacyjny zarażenia *T. spiralis* wykazano w eksperymentalnych modelach chorób autoimmunizacyjnych i alergicznych i w obu fazach zarażenia, jelitowej i mięśniowej w odpowiedzi dominowały Treg. Silniejszy wpływ łagodzący zarażenia pojawił się w fazie mięśniowej, przewlekłej^{10,11,12}. Za zjawisko to odpowiadają antygeny *T. spiralis*, gdyż wszystkie stadia rozwojowe pasożyta, wzbudzają produkcję różnych mediatorów, które zwiększają populację T_{reg} w zarażonym żywicielu. Uważa się, że ta immunomodulacja jest korzystna zarówno dla żywiciela, jak i pasożyta, ponieważ może ochronić nicienie przed wyeliminowaniem podczas silnej odpowiedzi immunologicznej, a osłabiając tę odpowiedź jednocześnie zapobiega procesom patologicznym wywołanym reakcją zapalną w narządach.

W czasie zarażenia *T. spiralis* pojawia się odpowiedź immunologiczna typu Th1 / Th2 z przewagą odpowiedzi Th2. Niepełna aktywacja komórek dendrytycznych, indukcja odpowiedzi makrofagów M2 czy odpowiedzi regulatorowej z udziałem limfocytów Treg lub Breg to mechanizmy przywracające homeostazę immunologiczną podczas zarażenia tym nicieniem¹³. Wiele badań dowiodło roli *Trichinella spiralis* w łagodzeniu chorób alergicznych oraz autoimmunizacyjnych.

Eksperymentalne autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia (EAE) u myszy to zwierzęcy model stwardnienia rozsianego (MS). Choroba charakteryzuje się przewlekłą zapalną demielinizacją komórek ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Za zmiany patologiczne w EAE odpowiadają komórki Th1 CD4⁺. Wykazano, że u myszy poddanych immunizacji *Schistosoma mansoni*, nasilenie EAE zmniejsza się¹⁴.

W innych badaniach natomiast wykazano, że pierwotniaki pasożytnicze zasiedlające tkankę nerwową mogą wywoływać choroby neurodegeneracyjne. Wykazano, że zarażenie pierwotniakiem *Toxoplasma gondii* wywołuje objawy Alzheimerera (AD) u myszy C57BL6, w tym wytwarzanie peptydu β -amyloidu (A β)¹⁵. Po zarażeniu tym gatunkiem pierwotniaka obserwowano zmiany typowe dla AD w mózgach samców myszy i myszy C57BL6: immunoreaktywność A β i hiperfosforylowane białko Tau. U myszy zarażonych obserwowano obumieranie neuronów, utratę ekspresji receptora N-metylo-d-asparagianu (NMDAR) i utratę węchowych neuronów czuciowych. Zarażenie *T. gondii* powodowało również zmiany w zachowaniu się zwierząt jak np. pojawienie się zachowań lękowych, zaburzenia pamięci przestrzennej i zmniejszoną wrażliwość węchową. To ostatnie odkrycie dotyczy wyłącznie samców myszy, ponieważ zarażone samice wykazują nienaruszoną wrażliwość węchową¹⁶.

1.2. Biologia i właściwości immunoregulacyjne *Heligmosomoides polygyrus bakeri*

Nicień *Heligmosomoides polygyrus bakeri* (*H.p.bakeri*), należy do rodziny *Trichostrongylidae*, rzędu Strongylida¹⁷. Jego środowisko życia to jelito cienkie gryzoni, przede wszystkim myszy¹⁸. W cyklu życiowym pasożyta występuje jeden żywiciel - ostateczny. Larwa L3 jest stadium inwazyjnym nicienia, a do zarażenia dochodzi drogą pokarmową¹⁹. Po przedostaniu się do jelita cienkiego żywiciela, larwy L3 kończą linienie rozpoczęte w środowisku zewnętrznym. W ciągu pierwszej doby, larwy migrują przez błonę śluzową jelita cienkiego, osiedlając się ostatecznie w mięśniach jelita. Jest to tkankowa faza zarażenia, trwająca ok. 8 dni²⁰. W tej fazie larwy stadium L4

linię i wychodzą do światła jelita jako stadium L5²¹. W ciągu 7 dni po zarażeniu (DPZ) w czasie fazy tkankowej zarażenia, do miejsca zasiedlonego przez larwy napływają leukocyty, przede wszystkim eozynofile i makrofagi, które tworzą ziarniniaki. Dorosłe nicienie ok. 8-10 DPZ, przemieszczają się do dwunastnicy. Tam owijają się wokół kosmków jelitowych i żywią się nabłonkiem błony śluzowej jelita. Po kopulacji, samice składają jaja, które dostają się do środowiska zewnętrznego z kałem myszy. Dorosłe nicienie mogą zasiedlać jelito myszy przez kilkanaście tygodni, hamując proces ich usuwania. Jest to przewlekła faza zarażenia. W środowisku zewnętrznym z jaj wykluwają się larwy L1, które linieją do stadium L2, by w końcu przejść niepełne linienie do stadium L3, będącym stadium inwazyjnym²².

Podczas zarażenia myszy *H. p. bakeri*, pojawiają się różne reakcje i mechanizmy immunomodulacyjne, przeciwzapalne obniżające aktywność układu odpornościowego żywiciela. W wyniku tych reakcji rozwój zmian patologicznych jest opóźniony, co można uznać za efekt terapeutyczny. Takie zjawisko obserwowano w zarażeniu *H. p. bakeri*; już w fazie tkankowej obserwowano cofanie się zmian neurodegeneracyjnych *in vivo* w modelu stwardnienia rozsianego, jednofazowego zapalenia mózgu i rdzenia (EAE), wywołanego działaniem peptydu MOG₃₅₋₅₅ u samic myszy C57BL6. Remisję EAE korelowano ze zmienioną liczbą leukocytów w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) i czasową przepuszczalnością bariery krew-mózg w fazie histotropowej zarażenia. Po 6 dniach od zarażenia, gdy objawy EAE prawie zanikły, liczba komórek CD25⁺ zwiększyła się z równoległym wzrostem liczby CD8⁺ i CD4⁺, zarówno CD25⁺ Foxp3⁺, jak i CD25⁺ Foxp3⁻ i makrofagów fenotypu M2. Zmiany fenotypu molekularnego w różnych populacjach komórek płynu mózgowo-rdzeniowego korelowały z zahamowaną proliferacją komórek T i podwyższonymi poziomami czynnika wzrostu nerwów i TGF-β. Uzyskane wyniki pomagają w zrozumieniu mechanizmów zaangażowanych w hamowanie odpowiedzi immunologicznej w OUN podczas zarażenia nicieniami²³.

W czasie zarażenia pasożyt wydziela białka modulacyjne, które obniżają odpowiedź immunologiczną za pośrednictwem komórek. Przeanalizowano proliferację komórek węzłów krezkowych myszy zarażonych *H. p. bakeri*, gdzie wykazano, że proliferacja komórkowa była silnie tłumiona w przewlekłej fazie zarażenia²⁴.

1.3. Charakterystyka odpowiedzi immunologicznej u osobników starych

Wraz z wiekiem aktywność układu odpornościowego pogarsza się, dochodzi do procesu immunosenescencji, czyli starzenia komórkowego. Zachodzi wiele zmian, między innymi zmienia się liczba dziewiczych limfocytów T oraz limfocytów B, różnorodność występujących na nich receptorów, ich reaktywność, czego efektem jest słabsza odpowiedź immunologiczna i spadek miana produkowanych przeciwciał. Zmienia się również profil wydzielniczy limfocytów na korzyść cytokin, chemokin i proteaz o właściwościach prozapalnych²⁵. Z upływem czasu równowaga przechyla się na korzyść komórek tłumiących aktywność układu immunologicznego, co prowadzi do zmniejszenia ilości komórek odpornościowych, a w wyniku tego również przeciwciał. Kolejna kwestia to zanik grasicy odpowiadającej za selekcję i dojrzewanie komórek odpornościowych. Prowadzi to do mniejszej liczby funkcjonalnych komórek. Oprócz tego hematopoetyczne składniki szpiku kostnego, które wytwarzają nowe komórki odpornościowe, są zastępowane przez tkankę tłuszczową. Wszystkie te zmiany prowadzą do obniżenia odporności u ludzi starszych²⁶. Wysznuło przypuszczenie, że starzenie się układu odpornościowego powodować może tzw. „mgłę umysłową” (brain fog) a także inne oznaki słabszej sprawności poznawczej. Nie sądzono, iż starzenie się tego układu powoduje starzenie się mózgu. Szybsza degeneracja mózgu- starzenie się tkanek odpowiadających za funkcje poznawcze- następuje tylko wtedy, kiedy na skutek tej erozji kumulują się uszkodzenia.

U ośmiotygodniowych myszy eksperymentalnie zmodyfikowano reakcje odpornościowe, symulując niedobór odporności, taki, który pojawia się w trakcie starzenia. Zaobserwowano osłabienie funkcji poznawczych. W kolejnym badaniu przeprowadzono test

na pamięć przestrzenną, gdzie sprawdzano zdolności kognitywne myszy młodych eksperymentalnie z postarzanym układem odpornościowym. Porównując osobniki ze zdrowym układem odpornościowym do młodych o zmodyfikowanej aktywności immunologicznej, u tych ostatnich stwierdzono osłabienie pamięci. Zatem czynnikiem kluczowym decydujący o zdolnościach kognitywnych to wiek układu odpornościowego, a nie sam wiek wynikający z długości życia myszy ²⁷.

1.4. Biologiczna rola surwiwiny

Surwiwina to białko, które należy do rodziny inhibitorów apoptozy ²⁸. Zbudowane jest ze 142 aminokwasów ²⁹. Przeciwdziała ono apoptozie hamując aktywność inicjatorowych oraz efektorowych kaspaz, a także wiążąc się z mikrotubulami wrzeciona mitotycznego, przez co hamując apoptozę zależną od mitochondriów. Surwiwina pełni również ważną rolę w cyklu komórkowym, zaś jej ilość regulowana jest na poziomie transkrypcji ³⁰. W warunkach fizjologicznych ekspresja surwiwiny ogranicza się do komórek takich jak tymocyty, komórki nabłonka jelita grubego oraz hematopoetyczne komórki macierzyste CD34⁺. Surwiwina znajduje się we wrzecionie kariokinetycznym, w centromerach a także w mitochondriach ³¹. Zbyt duża ilość tego białka występuje m.in. w przebiegu chorób nowotworowych ³².

Ilość surwiwiny zależy od fazy cyklu komórkowego. Bierze ona udział w jego regulowaniu, głównie przy przejściu komórki z fazy G1 do S. Zwiększona ilość białka pobudza podział komórki poprzez indukcję oporności na zatrzymanie w fazie G1 i przez przyspieszenie przejścia do kolejnej fazy-S. W fazie G2/M dochodzi do interakcji z wrzecionem kariokinetycznym, co doprowadza do zwiększenia ekspresji surwiwiny ³³. Oprócz regulacji cyklu komórkowego białko to odgrywa kluczową rolę w modulacji apoptozy. Zwiększona ekspresja białka w hodowlach linii komórkowych wiąże się z hamowaniem apoptozy wywołanej przez czynniki stymulujące wewnętrzne oraz zewnętrzne

szlaki apoptozy. Funkcję hamowania apoptozy przez surwiwinę wykazano *in vivo* u zwierząt doświadczalnych. Udowodniono też, że stosowanie antysensów surwiwiny wywołuje apoptozę, hamując proliferację komórek w hodowlach komórkowych *in vivo* i *in vitro* na grupach zwierząt eksperymentalnych³⁴. Surwiwina nie występuje w mitochondriach prawidłowych komórek. Czynniki indukujące śmierć komórki obniżają poziom mitochondrialnej surwiwiny, białko uwalniane zostaje do cytoplazmy, tam zapobiega aktywacji kaspaz hamując w ten sposób apoptozę³⁵.

Surwiwina jako inhibitor apoptozy zasługuje na uwagę z powodu tego, że nie stwierdza się jej w dojrzałych zróżnicowanych tkankach przy jednoczesnej zwiększonej ilości w tkankach dotkniętych chorobą, np. nowotworową³⁶.

W naszych badaniach surwiwina została wykorzystana jako marker do oznaczenia kondycji fizjologicznej tkanki nerwowej myszy.

1.5. Funkcje cytokin: IL-6, IL-10, TGF- β

Interleukina 6 cechuje się wielostronnością oddziaływań i jest jednym z najważniejszych czynników, które regulują mechanizmy obronne. Jej funkcja to udział w odpowiedzi immunologicznej, w reakcji zapalnej a także w krwiotworzeniu. Działa ona na bardzo wiele komórek. IL-6 wydzielają głównie monocyty i makrofagi, ale też: limfocyty B i T, chondrocyty, keratynocyty, komórki śródbłónka czy fibroblasty. Natomiast czynnikiem, który indukuje jej wytwarzanie jest przede wszystkim IL-1, również TNF, interferony, LPS oraz wirusy. Wydzielanie TNF oraz IL-1 jest hamowane zwrotnie przez IL-6. Na początku zaliczano ją do cytokin prozapalnych, jednak w chwili obecnej wiadomo, że ma także działanie przeciwzapalne. Uważa się, że wykorzystanie neurotropowego działania IL-6 może posłużyć do zapobiegania degeneracji neuronów w wybranych chorobach ośrodkowego układu nerwowego. Cytokina ta może m.in. pobudzać syntezę białek ostrej fazy

w wątrobie, podtrzymywać przeżycie neuronów, pobudzać komórki progenitorowe szpiku i wytwarzanie płytek krwi a także regulować metabolizm i stymulowanie resorpcji kości. Interleukina-10 jest wydzielana przede wszystkim przez pobudzone limfocyty T, zwłaszcza Th2, lecz również przez limfocyty B, makrofagi, keratynocyty czy monocyty³⁷.

IL-10 pełni kilka ważnych funkcji, dzięki czemu hamuje odpowiedź immunologiczną typu komórkowego oraz odpowiedź zapalną; hamuje proliferację limfocytów Th1 aktywowanych przez antygen, produkcję cytokin przez limfocyty Th1, takich jak: IL-2, IL-3, IFN- γ . Hamuje syntezę cytokin w makrofagach i monocytach, takich jak IL-1 α , IL-6 czy GM-CSF, a także związków tlenowych oraz tlenku azotu. IL-10 pobudza wzrost i różnicowanie aktywowanych limfocytów B, limfocytów Tc i komórek NK³⁸.

TGF- β produkowany jest przez wiele komórek układu odpornościowego; przez neutrofile, makrofagi, limfocyty czy płytki krwi. Jego rola polega głównie na hamowaniu proliferacji limfocytów B i T, a także komórek NK. Zmniejsza on wydzielanie kilku cytokin hamując ekspresję cząsteczek MHC klasy II i produkcję limfocytów Tc. TGF- β jest czynnikiem zwrotnie regulującym odpowiedź immunologiczną, ponieważ wydzielany jest m.in. przez pobudzone limfocyty B oraz T. Działa chemotaktycznie na monocyty, limfocyty T i neutrofile³⁹.

1.6. Schorzenia neurodegeneracyjne i ich podłoże

Choroba Alzheimera (AD) jest postępującą chorobą neurodegeneracyjną⁴⁰. Cechą charakterystyczną tego schorzenia są zmiany morfologiczne, obecność płytek starczych (zewnątrzkomórkowe agregaty peptydu β -amyloidu ($A\beta$)) oraz splotów neurofibrylarnych (wewnątrzkomórkowe kompleksy hyperfosforylowanego białka Tau), które są zlokalizowane

w rejonach mózgu odpowiedzialnych za pamięć, uczenie się oraz emocje. Najważniejsze mechanizmy związane z tą chorobą dotyczą dysfunkcji mitochondriów, generacją wolnych rodników a także zaburzeń integralności błon biologicznych. Rola mediatorów reakcji zapalnej w patogenezie choroby Alzheimera jest bardzo skomplikowana. Regiony mózgu, w których obecne są płytki starcze i sploty neurofibrylarne, charakteryzują się obniżoną ilością połączeń synaptycznych i spadkiem liczby neuronów. Istnieje wiele hipotez, tłumaczących rozwój stanu zapalnego w mózgu. Prekursor peptydów A β jest białkiem transmembranowym, zbudowanym z dużej, glikozylowanej zewnątrzkomórkowej domeny, odcinka penetrującego błonę biologiczną i małego cytoplazmatycznego fragmentu. Rozpuszczalne formy A β mogą być transportowane przez barierę krew – mózg z udziałem specyficznych receptorów bądź podlegają swobodnej dyfuzji. W przenoszenie amyloidu β do krwioobiegu zaangażowane są błonowe białka LRP (lipoprotein receptor-related protein) oraz P-gp (glycoprotein P). W przeciwnym kierunku, do komórki A β transportowany jest przez makrocząsteczki: RAGE (receptor for advanced glycation end products) i Gp330 (glycoprotein 330)⁴¹. W doświadczeniach prowadzonych *in vitro*, a także w modelach zwierzęcych zauważono, że upośledzone działanie ww. białek prowadzi do magazynowania A β w mózgu^{42,43,44,45}.

Mózg w chorobie Alzheimera wykazuje przewlekłą odpowiedź zapalną charakteryzującą się aktywowanymi komórkami glejowymi i zwiększoną ekspresją cytokin i czynników dopełniacza otaczających złogi amyloidu⁴⁶.

W chorobie Alzheimera dochodzi do uszkodzenia komórek, do ostrego stanu zapalnego a tym samym do zwiększonej ekspresji cytokin prozapalnych. Nasze badanie miało na celu sprawdzenie, czy wcześniejsze zarażenie myszy *H. p. bakeri* wpływa na rozwój stanu zapalnego wzbudzonego toksyną krztuśca w układzie nerwowym u myszy w wieku starczym.

1.7. Toksyna krztuśca

Krztusiec jest zakaźną chorobą dróg oddechowych wywoływaną przez bakterie Gram-ujemne z gatunku *Bordetella pertussis*. Najczęściej występuje u niemowląt oraz małych dzieci. Zanim opracowano szczepionkę, powszechnie występujący krztusiec był jedną z najczęstszych przyczyn zgonów wśród dzieci do 9 roku życia. Od wielu lat krztuścowi zapobiega się przez powszechne szczepienia⁴⁷. Szczepionka zawierająca inaktywowaną toksynę krztuśca pobudza wytwarzanie przeciwciał neutralizujących toksynę bakterii.

Typowym objawem klinicznym krztuśca, występującym u niezaszczepionych dzieci jest długotrwały kaszel napadowy, któremu zwykle towarzyszy odkrztuszanie lepkiej, śluzowatej plwociny, a niekiedy wymioty i duszności⁴⁸.

Zakażenie *B. pertussis* rozpoczyna się od kolonizacji dróg oddechowych^{49,50}. Bakteria oddziałuje z komórkami nabłonka błony śluzowej wykorzystując czynniki wirulencji, dzięki czemu dochodzi do adhezji *B. pertussis* do komórek urzęsionych. Do adheryn *B. pertussis* należą białka - hemaglutynina włókienkowa (FHA), fimbrie (Agg, Fim) i pertaktyna (PRN). Bakteria produkuje też białkowe toksyny pomagające w adhezji i transmisji, do których należą toksyna krztuśca (BpT), cyklaza adenylowa i system wydzielniczy typu III.

U myszy toksyna krztuśca (BpT) wzbudza stan zapalny. W wyniku wzrostu ekspresji receptora dla czynnika C3 dopełniacza (CR3) pod wpływem toksyny, wzrasta adhezja bakterii do makrofagów. Peptydoglikan uwalniany ze ściany komórkowej *B. pertussis* - cytotoksyna tchawicza (TCT) oraz składnik zewnętrznej błony komórkowej - lipooligosacharyd (LOS) działają synergistycznie i niszczą urzęsione komórki nabłonka układu oddechowego. Do niszczenia dochodzi pod wpływem uwalnianych reaktywnych form tlenu (ROS), np. tlenku azotu (NO) w sąsiadujących komórkach nieurzęsionych, wydzielających śluz⁵¹. Uszkodzone rzęski nie usuwają śluzu, gromadzącego się w drogach

oddechowych, co utrudnia usuwanie bakterii. LOS aktywuje szlak sygnałowy TLR-4 wywołując również produkcję cytokin prozapalnych (IL-1, IL-6). TCT hamuje syntezę DNA w komórkach nabłonkowych tchawicy co powoduje cytotoksyczne zmiany w urzęsionych komórkach. Toksyna dermonekrotyczna (DNT) to polipeptyd cytoplazmatyczny wywołujący stan zapalny, skurcz naczyń krwionośnych i patologiczne zmiany martwicze.

Toksynę tę można użyć do aktywacji reakcji zapalnej u myszy. W naszych badaniach użyta została do wywołania ogólnoustrojowego zapalenia u myszy starych.

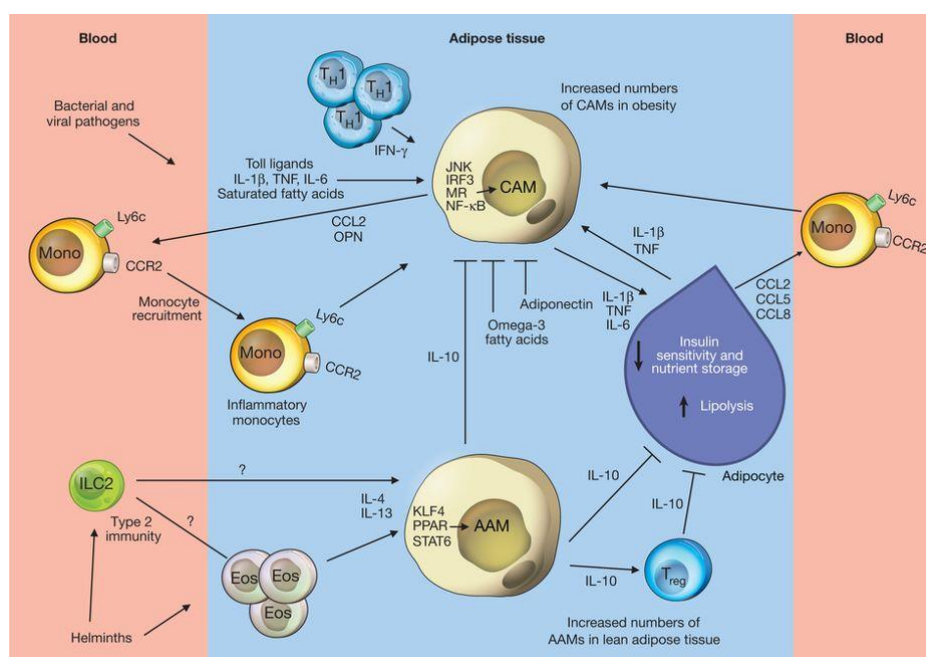
1.8. Makrofagi M2

Makrofagi są ważnym celem terapeutycznym, ale niezbędne jest zrozumienie ich fenotypów w zależności od ich cech, lokalizacji anatomicznej oraz pochodzenia⁵². Mikrośrodowisko może regulować fenotyp i funkcję makrofagów z ich prekursorów, oraz różnicowanie specyficzne dla linii do w pełni zróżnicowanych komórek⁵³. Makrofagi różnicują się w tkankach, przede wszystkim w podśródbłonkowej tkance łącznej, zatokach limfatycznych wątroby, śledziony oraz węzłów i tam gdzie pojawiają się antygeny. Ich prekursorzy- monocyty- krążą tylko kilka godzin zanim wnikną do tkanek, gdzie mogą żyć tygodniami lub miesiącami jako dojrzałe makrofagi⁵⁴.

Różnorodność i plastyczność to dwie cechy makrofagów. Makrofagi M1 (klasycznie aktywowane makrofagi) są prozapalne i biorą udział w obronie gospodarza przed infekcją, podczas gdy makrofagi M2 są związane z reakcjami przeciwzapalnymi, przebudową tkanek i reprezentują końcowe pełne spektrum aktywacji makrofagów. Transformacja różnych fenotypów makrofagów reguluje inicjację, rozwój i zahamowanie chorób zapalnych⁵⁵. Aktywację makrofagów stwierdzono w chorobach autoimmunologicznych i zapalnych⁵⁶.

W 1990 r. Abramson i jego współpracownicy zauważyli, że interleukina 4 (IL-4), która była głównie wytwarzana przez komórki Th2, może wprowadzać makrofagi w stan aktywacji,

inny niż przy aktywacji indukowanej $\text{IFN-}\gamma$ ⁵⁷. Dwa lata później po raz pierwszy zaproponowano koncepcję makrofagów M2 ⁵⁸. W następnych latach stopniowo badano plastyczność makrofagów w odpowiedzi na różne środowiska. Oprócz IL-4 / IL-13, bodźce, takie jak kompleksy immunologiczne przeciwciał wraz z lipopolisacharydem (LPS) lub IL-1, transformujący czynnik wzrostu- β (TGF- β), glukokortykoidy i IL-10, mają zdolność alternatywnej aktywacji makrofagów ⁵⁹. Fenotyp M2 charakteryzują między innymi cząsteczki, takie jak arginaza1 (Arg1), IL-10 czy Mrc1 (CD206), które uczestniczą w inwazji pasożytów, przebudowie tkanek i progresji nowotworu (funkcje immunoregulacyjne) ⁶⁰. Zarówno makrofagi M1, jak i M2 biorą udział w reakcji przeciw pasożytom, w zależności od ich gatunku i fazy zarażenia. W zarażeniach pasożytniczych ludzi i zwierząt dominuje odpowiedź makrofagów populacji M2 ^{61, 62}. W badaniu wykorzystującym myszy model zarażenia filariami wykazano, że makrofagi, ekspozycje na cytokiny Th2 i sygnały przeciwzapalne *in vivo* przez długi czas, mogą nadal rozwijać klasycznie aktywowany fenotyp w odpowiedzi na LPS lub $\text{IFN-}\gamma$ i stać się przeciwdrobnoustrojowymi poprzez wytwarzanie NO ⁶³.



Rys. 1 Mechanizmy polaryzacji makrofagów. Przedstawiono główne szlaki polaryzacji makrofagów ⁶⁴.

Podsumowując, próby zmiany fenotypu makrofagów typowego dla inicjacji, rozwoju, regulacji i zahamowania chorób zapalnych poprzez wzbudzenie odpowiednich szlaków sygnałowych w komórce oraz zmiana lokalnego mikrośrodowiska stanowi wyzwanie dla opracowania terapii różnych chorób zapalnych. Terapeutyczne próby przywrócenia równowagi fizjologicznej powinny zatem uwzględniać lokalizację anatomiczną i mikrośrodowisko makrofagów.

1.9. Cel pracy

Celem pracy było zbadanie wpływu zarażenia *H. p. bakeri* na poziom reakcji zapalnej w mózgu, podczas ogólnoustrojowego zapalenia wywołanego przez toksynę krztuśca u myszy w wieku starczym.

Porównane zostały:

- poziom ekspresji receptorów w komórkach płynu mózgowo-rdzeniowego myszy kontrolnych w wieku 13 mies. (52 tygodni) oraz myszy w wieku 6 mies. (24 tygodni) i 13 mies. (52 tygodni) zarażonych *H.p.bakeri*
- poziom białka surwiwiny u myszy starych (52 tygodniowych), które w wieku 12 tygodni były zarażone *H.p.bakeri* i naturalnie pozbyły się nicieni
- poziomy cytokin prozapalnych i regulatorowych

.

1.10. Hipoteza badawcza

Zarażenie myszy *H. p. bakeri* powoduje długotrwałe obniżenie poziomu reakcji zapalnych w mózgu, utrzymujące się do wieku starczego myszy. Wzbudzane mechanizmy regulatorowe doprowadzają do zahamowania odpowiedzi zapalnej wywołanej pod wpływem toksyny krztuśca.

2. Materiały i metody

2.1. Oświadczenie dotyczące etyki

Wszystkie procedury eksperymentalne zostały przeprowadzone zgodnie z Polską Ustawą o Doświadczeniach Zwierząt i Dyrektywą 2010/63 / UE i zatwierdzone przez Pierwszy Lokalny Komitet Etyczny ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie z aprobatą ID 151/2011.

2.2. Pasożyt i zwierzęta doświadczalne

Doświadczenie przeprowadzono na myszach szczepu C57BL/6. Myszy przebywały w zwierzętarni na Wydziale Biologii. Umieszczono je w trzech grupach. Grupy I i III liczyły po 5 osobników, zaś grupa II 4 osobniki. Klatki znajdowały się w pomieszczeniu, w którym przestrzegano następujących warunków: temperatura 24-25°C, wilgotności 50% i światło/ciemność w cyklu 12 h / 12 h. Myszy miały stały dostęp do wody i pokarmu.

Zwierzęta miały 8-10 tygodni na początku badania. Grupa I- kontrolna składała się z niezarażonych myszy. Myszy z grupy II i III zarażano drogą pokarmową 200 larwami (L3) *Heligmosomoides polygyrus bakeri* (*Hpb*).

Oznaczenia grup myszy:

I - **Kontr** - myszy kontrolne poddane badaniu w wieku 52 tygodni

II - **24Hpb**- myszy poddane badaniu w wieku 24 tygodni, zarażone *Hpb* w wieku 12 tygodni

III - **52Hpb**- myszy poddane badaniu w wieku 52 tygodni, zarażone *Hpb* w wieku 12 tygodni

2.3. Pozyskanie płynu mózgowo-rdzeniowego (CSF)

i homogenatu mózgu

Myszy usypiano dwutlenkiem węgla przez 1 minutę. Wyizolowano mózg wraz z rdzeniem przedłużonym i ważono narząd. Następnie mózgi umieszczano w 2 ml PBS pH 7.2 (80x rozcieńczenie) i mieszano na mieszadle probówkowym przez 30s, po czym przecedzono przez sitko do falkonu i wirowano 1800 rpm w 4°C przez 7 minut. W przesączonym płynie oznaczano liczbę komórek w komorze Burkera i użyto do oznaczeń fenotypu receptorowego w FACS. Płyn z nad osadu zamrażano i używano do dalszych oznaczeń. Mózg po wypłukaniu umieszczono w 1 ml PBS i przeznaczono do przygotowania homogenatu.

Po zważeniu mózgu i pozyskaniu CSF, mózgi homogenizowano. W tym celu oddzielano od mózgu rdzeń przedłużony, a sam narząd rozdrabniano i przetarto przez sitko do 1ml zimnego PBS pH 7.2, 4°C. Następnie homogenat wirowano w 2000 rpm, w 4°C, 7 minut. Płyn z nad osadu i osad komórkowy zamrażano osobno.

2.4. Barwienie makrofagów i analiza FACSVerse

Świeżo wyizolowane makrofagi znakowano przeciwciałami monoklonalnymi a-CD3 FITC, anty-CD11b PercP, anty-CD206 APC, anty-CD80 PE (PharMingen). Barwienie receptorów przeprowadzono zgodnie z protokołami dostarczonymi przez firmy. Analizę makrofagów przeprowadzono przy użyciu FACSVerse w oprogramowaniu FACSDiva. Wyniki przedstawiono jako procent komórek z dodatnim wybarwieniem.

Celem naszych badań było określenie zawartości makrofagów w płynie mózgowym po stymulacji *H. polygyrus bakeri*.

2.5. Oznaczanie stężenia surwiwiny

Stężenia surwiwiny oznaczano metodą ELISA, gotowym zestawem do tego przeznaczonym (Abcam, Cambridge, The United Kingdom).

W każdej grupie myszy porównano poziom surwiwiny pomiędzy myszami niestymulowanymi (Kontr; 24*Hpb*; 52*Hpb*) i stymulowanymi toksyną krztuśca -*B. pertusis* (Kontr+BpT; 24*Hpb*+BpT; 52*Hpb*+BpT).

2.6. Oznaczanie poziomu cytokin regulatorowych i prozapalnych

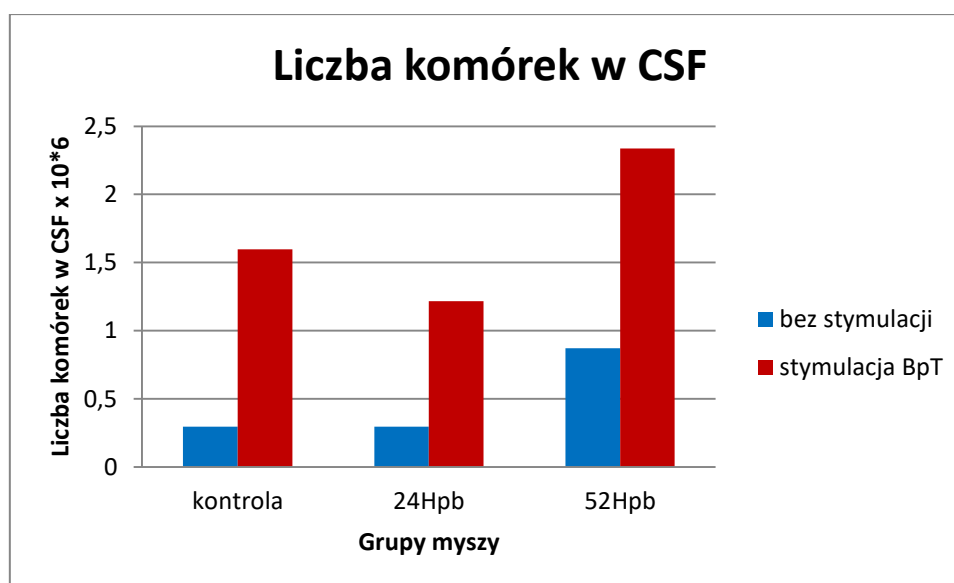
Poziomy cytokin w supernatancie z homogenatu mózgu oznaczano metodą ELISA. Stężenia IL-10, IL-6 i TGF- β ustalono stosując przeciwciała monoklonalne zgodnie z wytycznymi producenta (e-Biosciences, San Diego, USA). Do pomiaru TGF- β próbki zakwaszono, aby aktywować cytokinę. W tym celu naniesiono supernatant z homogenatu mózgu na płytkę do rozcieńczeń, po czym dodano po 10 μ l 1N HCl/dołek. Inkubowano 10 minut. Następnie dodano po 10 μ l NaOH/dołek w celu neutralizacji kwasu w próbie. Tak przygotowany supernatant naniesiono na płytkę do ELISA. Wartość ekstynkcji odczytywano przy $\lambda = 450$ nm w spektrofotometrze, μ -Quant (BD, Costar, Acton, MA, USA). Średnie gęstości optyczne (OD) próby w dwóch powtórzeniach porównano ze standardowymi krzywymi wyznaczonymi dla kolejnych rozcieńczeń rekombinowanych cytokin.

3. Wyniki

3.1. Masa mózgu oraz liczba komórek w CSF

Tabela 1. Masa mózgu oraz liczba komórek w płynie mózgowo-rdzeniowy:

Grupa	Numer myszy	Masa mózgu [g]	Liczba komórek w CSF x 10 ⁶
52Hpb	1	0,498	1,00
	2	0,500	0,74
	3	0,518	4,50
	4	0,453	0,28
	5	0,471	2,23
Średnia ± SD		0,488±0,026	
24Hpb	1	0,489	0,05
	2	0,502	0,54
	3	0,496	1,13
	4	0,473	1,30
Średnia ± SD		0,490±0,013	
kontr	1	0,481	0,33
	2	0,508	0,26
	3	0,482	1,03
	4	0,481	1,30
	5	0,499	2,46
Średnia ± SD		0,490±0,013	

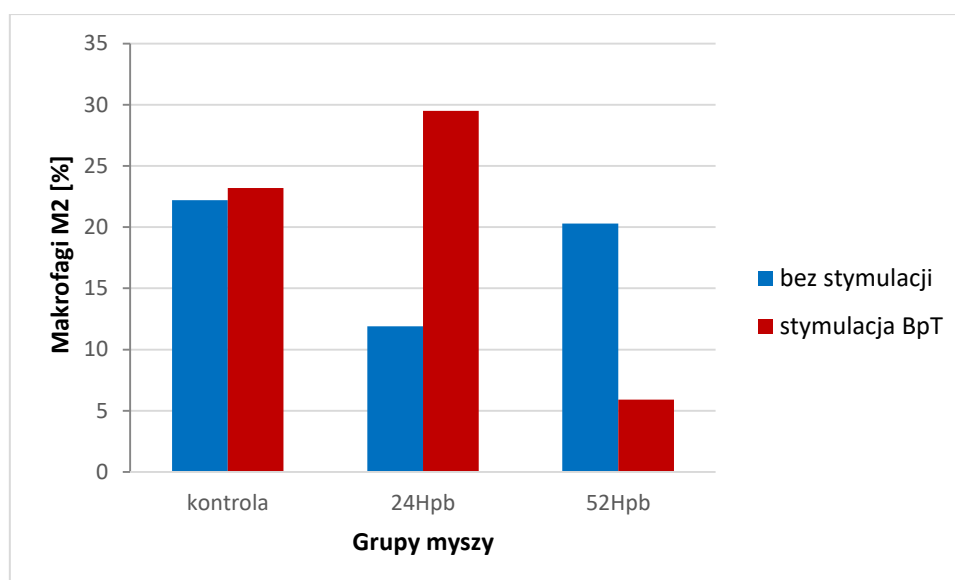


Nie stwierdzono wpływu wieku i zarażenia na masę mózgów wyizolowanych od myszy w wieku 52 tygodni i 24 tygodni. Liczba komórek w płynie mózgowo-rdzeniowym

była zmienna we wszystkich grupach i zmiany te nie były istotne statystycznie. Wyniki wskazują na brak różnic między grupami. Oznaczenie mokrej masy mózgu nie jest miarodajnym czynnikiem do ustalenia różnic między myszami w różnym wieku. Izolowanie komórek z płynu mózgowo rdzeniowego wymaga opracowania metodyki pozwalającej uzyskać przybliżone ilości komórek u myszy kontrolnych, lub wyjaśnienia przyczyny tak rozbieżnych ilości.

3.2. Analiza makrofagów przy użyciu FACSVerse

Wykres 1. Zawartość procentowa makrofagów M2 w płynie mózgowo-rdzeniowym:



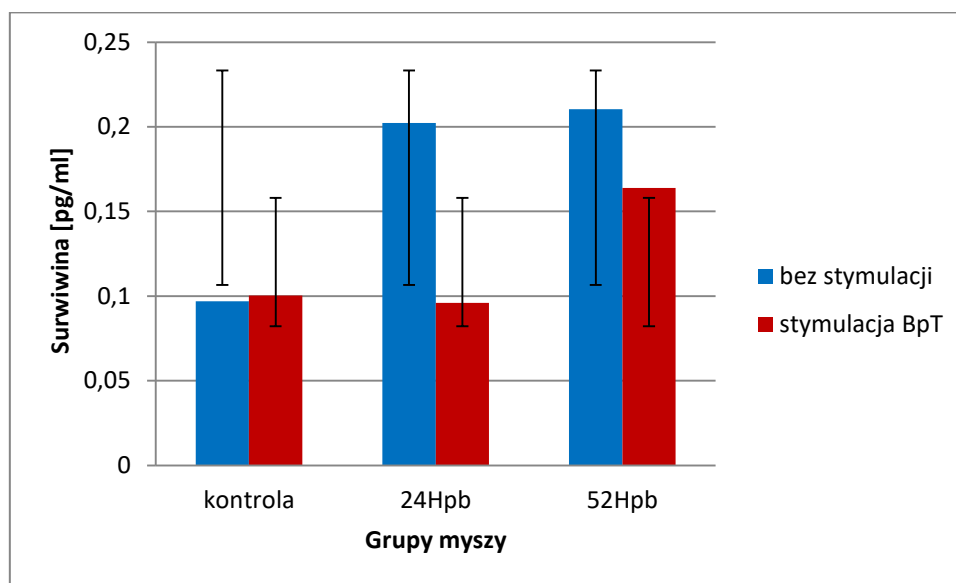
Wyniki pierwszej części badań są następujące:

- w CSF myszy jednorocznych dominowały makrofagi M2
- u myszy kontrolnych po stymulacji BpT nie zaobserwowano żadnych zmian
- zmiany związane z wiekiem myszy zarażonych *Hpb*: odsetek makrofagów M2 był mniejszy u młodszych myszy (11,9%) niż u jednorocznych (20,3%)
- po stymulacji BpT odsetek makrofagów M2 wzrósł z 11,9% do 29,5% u młodszych myszy, ale u starszych myszy zmniejszył się z 20,3 % do 5,9%

Stymulacja myszy toksyną BpT odzwierciedlała różnice w odpowiedzi M2 związane z wiekiem myszy zarażonych *Hpb*; u starszych myszy populacja makrofagów M2 zmniejszyła się prawie cztery razy w porównaniu do myszy kontrolnych. Odpowiedź w mózgu myszy po 24 tygodniach po zarażeniu była inna niż u myszy, która właśnie usunęła pasożyta tydzień temu. Po zarażeniu młodszych myszy *Hpb*, odsetek M2 zmniejszył się w mózgu, jednak po stymulacji toksyną BpT wzrósł i osiągnął nawet wyższą wartość niż w kontroli.

3.3. Poziom surwiwiny

Wykres 2. Zmiany stężenia surwiwiny w homogenacie mózgu po dootrzewnowej stymulacji zapalenia toksyną krztuśca u myszy:



U myszy 24Hpb i 52Hpb, po przebytych zarażeniu *Hpb*, podnosi się poziom surwiwiny w mózgu.

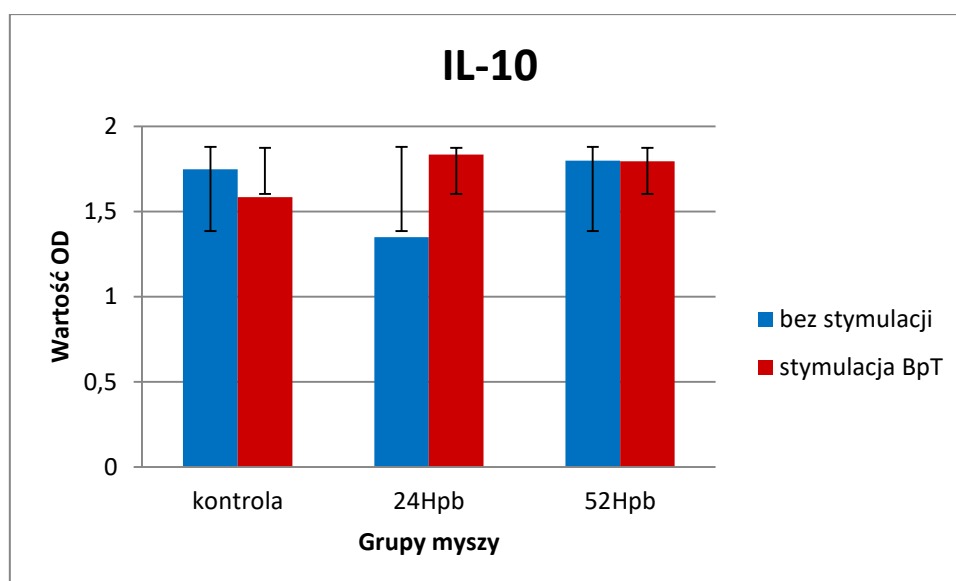
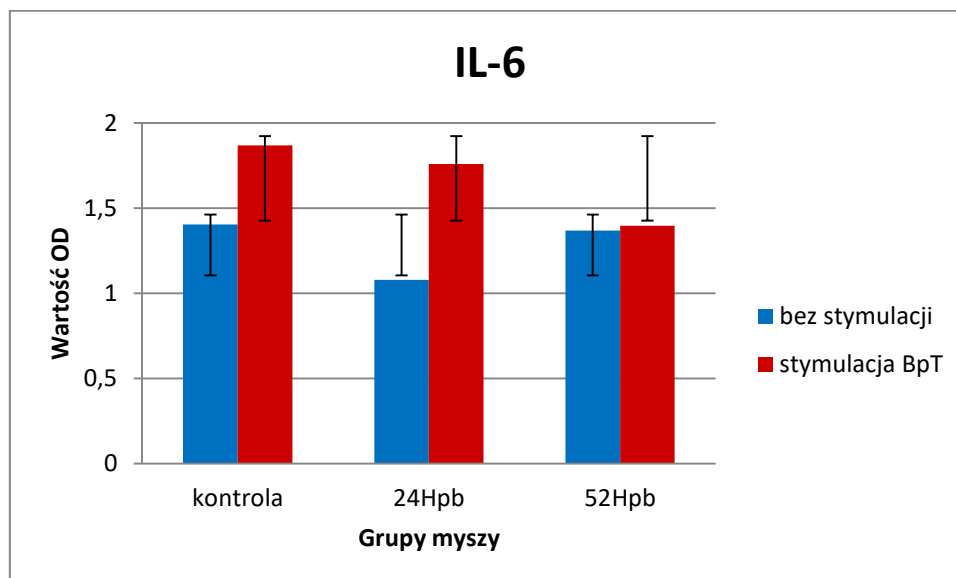
Po wzbudzeniu stanu zapalnego toksyną krztuśca poziom surwiwiny znacznie spada.

U myszy 24Hpb hamowanie jest silniejsze niż u myszy 52Hpb.

U myszy kontrolnych (52 tyg) toksyna nie wpływa na zmiany poziomu białka.

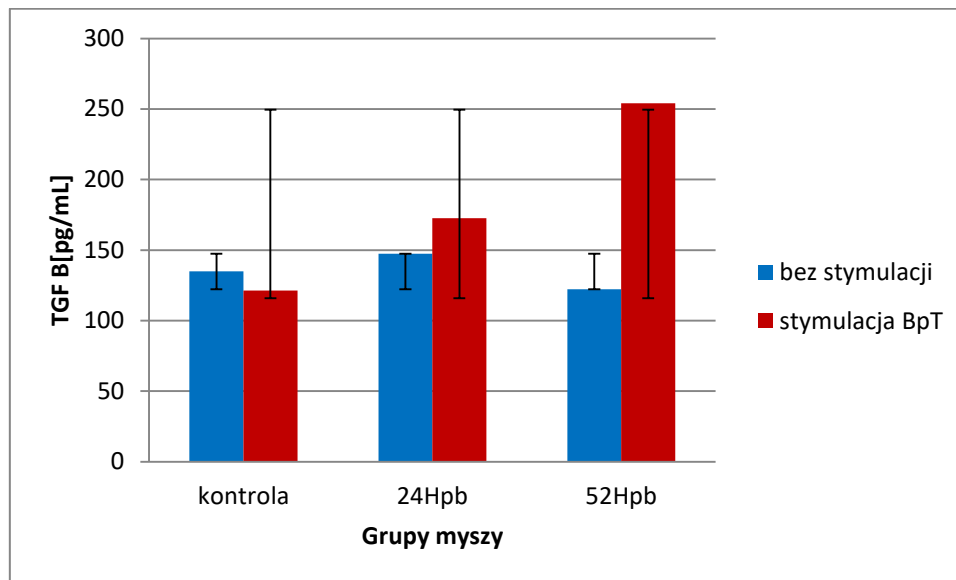
3.4. Wartość OD dla cytokin: IL-6 i IL-10

Wykres 3, 4. Wartość OD dla cytokin IL-6, IL-10 w homogenacie mózgu w teście ELISA:



3.5. Poziom TGF- β

Wykres 5. Stężenie TGF- β w supernatancie z nad homogenatu w teście ELISA:



4. Dyskusja

Pierwsza część naszych badań skupiała się wokół typu komórek odpornościowych w płynie mózgowo-rdzeniowym u myszy. Wyniki pokazały, że dominują tu makrofagi M2. Komórki te, w zależności od wieku zwierząt, charakteryzowały się odwrotną dynamikę reagowania na toksynę. U myszy *52Hpb*, po stymulacji toksyną krztuśca, populacja komórek M2 była mniejsza niż u myszy kontrolnych. Sugeruje to wpływ wieku i zarażenia na liczebność populacji tych komórek. Jeśli chodzi o młode osobniki (*24Hpb*) to sam proces zarażenia pasożytem spowodował zmniejszenie ilości komórek M2. Zaś podanie toksyny wywołało gwałtowny wyrzut tych komórek do mózgu. Krótszy czas od przebycia zarażenia utrzymuje więc makrofagi regulatorowe w mózgu w odróżnieniu od myszy starych. Nasuwa się zatem pytanie, czy może makrofagi M2 są komórkami opływającymi mózg. W tym celu

należałoby zbadać ilość komórek M2 w mózgach młodych myszy, które nie przeszły zarażenia. W naszym badaniu mamy dane tylko młodych myszy poddanych immunoregulacji podczas zarażenia pasożytem. Wiemy, że w czasie etapów zarażenia *Hpb* jest taki okres, kiedy bariera krew-mózg jest krótkotrwale przepuszczalna dla komórek. To może ułatwiać migrację M2 przez barierę ⁶⁵.

Idąc dalej, widoczne jest minimalne zwiększenie liczby makrofagów M2 w odpowiedzi na toksynę w grupie kontrolnej. Makrofagi M2 w zależności od podtypu (M2a, M2b, M2c) mogą wydzielać m.in. IL-6 i IL-10 ⁶⁶. Zestawiając wykresy można zauważyć, że u myszy *24Hpb* ilość makrofagów M2 po stymulacji toksyną BpT gwałtownie rośnie. To wyjaśnia znaczny wzrost stężenia obu cytokin w mózgu tych myszy.

Dodatkowo niejednorodność immunofentypu makrofagów jest częsta. Przykładem tego może być obserwacja, że makrofagi M2 pochodzące z monocytów krążących wykazują ekspresję molekuly CD206, zaś makrofagi M2 pochodzące z komórek osiadłych w tkance są CD206-ujemne ⁶⁷. Makrofagi w naszym badaniu wykazały ekspresję molekuly CD206.

W badaniach wykazano, że różnicujące się makrofagi w kierunku M2 redukują wydzielanie cytokin prozapalnych ⁶⁸.

Wykazano również, że makrofagi M2 wywołują immunosupresję, czyli inaktywację reakcji komórek odpornościowych ⁶⁹. Tłumaczyłoby to stały poziom IL-6 i IL-10 u myszy *52Hpb*, gdzie stymulacja toksyną nie wzbudziła silniejszego stanu zapalnego.

„Pozytywne” znaczenie makrofagów M2 zaobserwowano w mięśniu sercowym po zawale. Najpierw napływały tam liczne makrofagi M1, które tworzyły ognisko zapalne, a po tym okresie pojawiała się duża ilość makrofagów M2 wykazujących zdolność gojenia uszkodzenia i ograniczających miejscowy stan zapalny ⁷⁰. Ważną funkcją makrofagów jest migracja, dzięki której komórki te mogą brać udział w reakcjach zapalnych. Typ M2

wykazuje większe zdolności migracyjne niż M1. Różnice dotyczą rozmieszczenia włókien kurczliwego białka aktyny: w makrofagach typu M2 aktyna jest równomiernie rozmieszczona w cytoplazmie komórki, zaś w makrofagach M1 białko to znajduje się wyłącznie w zewnętrznej warstwie cytoplazmy⁷¹.

Przebyte zarażenie myszy *H.polygyrus bakeri* powoduje wzrost poziomu surwiwiny w mózgu. Pod wpływem toksyny krztuśca (BpT) produkcja surwiwiny obniża się wyraźniej u myszy w wieku 24 tygodni niż 52 tygodniowych. Toksyna hamuje produkcję surwiwiny istotniej u myszy półrocznych (24 tygodnie), tuż po usunięciu 3 miesięcznej inwazji *H/p. bakeri*.

Myszy roczne (52Hpb) słabiej reagują na działanie BpT, gdyż po tej stymulacji poziom surwiwiny obniża się w nieznacznym stopniu. Stan zapalny wywołany przez *H/p. bakeri* podwyższa poziom surwiwiny w mózgu, natomiast ponowne wzbudzenie stanu zapalnego obniża poziom białka. U młodych myszy przywrócony zostaje stan kontrolny, u starych nie.

Reasumując, zarażenie pasożytem powoduje wzrost poziomu surwiwiny w mózgu myszy, jednak w wyniku stymulacji BpT (ponownego stanu zapalnego) dochodzi do obniżenia poziomu tego białka.

Poziom IL-6 nie wykazuje zmian u myszy rocznych zarażonych *H/p. bakeri*. i stymulowanych BpT. Natomiast u myszy półrocznych, po stymulacji BpT, poziom tej cytokiny podnosi się, podobnie jak u niezarażonych. Zdolność do produkcji IL-6 jest utrzymana u myszy kontrolnych oraz młodszych. U myszy, które były zarażone nicieniem 24Hpb, wcześniej stwierdzono hamowanie produkcji IL-6 w tkance nerwowej mózgu.

Podobnie stare myszy roczne zarażone *H/p. bakeri*, słabiej reagują na BpT i poziom IL-10 nie zmienia się. U myszy półrocznych stwierdzono podwyższenie poziomu IL-10 po stymulacji BpT, obniżonego przez zarażenie nicieniem. Myszy kontrolne stare słabo

reagują na podanie BpT, choć poziom IL-10 nieznacznie obniża się. U młodych myszy zarażonych widoczne są niższe poziomy IL-6 i IL-10. U myszy rocznych obserwuje się areaktywność komórek.

Stężenie TGF- β zmienia się w mózgu. Jego poziom podnosi się u myszy zarażonych *H/p. bakeri* po stymulacji toksyną krztuśca. Jest on najwyższy u myszy w grupie 52Hpb+BpT, czyli myszy te wykazują dużo silniejszą reakcję komórek odpornościowych. Dużo wyższy poziom TGF- β po ponownym wzbudzeniu stanu zapalnego świadczy o utrzymanej pamięci regulatorowej.

Jeśli chodzi o dane dotyczące masy mózgów myszy, to nie zauważono znacznych różnic. Natomiast patrząc na wykres pokazujący ilość komórek widać, że we wszystkich grupach myszy stymulacja toksyną spowodowała zwiększenie liczby komórek.

Podsumowanie

Odpowiedź M2-makrofagów zmieniała się w zależności od wieku myszy po stymulacji BpT- wyłącznie u zwierząt zarażonych pasożytem. Populacja komórek zmniejszyła się u starych myszy i zwiększyła u myszy sześciomiesięcznych po stymulacji BpT. Poziom przeżywalności wzrósł po zarażeniu *H/p. bakeri* jednak spadł w reakcji na BpT.

U sześciomiesięcznych myszy poziomy IL-6 i IL-10 zmniejszyły się po zarażeniu, lecz wzrosły po stymulacji odpowiedzi na toksynę. Stężenie TGF- β wzrosło u zwierząt zarażonych *Hpb*, zwłaszcza u myszy jednorocznych po BpT.

Wczesne zarażenie nicieniami może wpływać na przebieg odpowiedzi immunologicznej w mózgu myszy w wieku starczym. Potrzebne są dalsze szczegółowe badania, by określić rolę nicieni w ochronie tkanki nerwowej przed stanem chorobowym spowodowanym reakcjami immunologicznymi.

5. Bibliografia

-
- ¹ Ashour DS (2013): **Trichinella spiralis immunomodulation: an interactive multifactorial process**. Expert Review of Clinical Immunology ; Volume 9, Issue 7; Pages 669-675.
- ² Park HK, Cho MK, Choi SH, Kim YS, Yu HS (2011): **Trichinella spiralis: infection reduces airway allergic inflammation in mice**. Exp. Parasitol. 127(2), 539–544.
- ³ Khan WI, Blennerhasset PA, Varghese AK et al. (2002): **Intestinal nematode infection ameliorates experimental colitis in mice**. Infect. Immun. 70(11), 5931–5937.
- ⁴ Ashour DS, Othman AA, Shareef MM, Gaballah HH, Mayah WW (2013): **Interactions between Trichinella spiralis infection and induced colitis in mice**. J. Helminthol. doi:10.1017/S0022149X13000059, 1–9.
- ⁵ Saunders KA, Raine T, Cooke A, Lawrence CE (2007): **Inhibition of autoimmune type 1 diabetes by gastrointestinal helminth infection**. Infect. Immun. 75(1), 397–407.
- ⁶ Gruden-Movsesijan A, Ilic N, Mostarica-Stojkovic M, Stosic-Grujicic S, Milic M, Sofronic-Milosavljevic L (2010): **Mechanisms of modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by chronic Trichinella spiralis infection in Dark Agouti rats**. Parasite Immunol. 32(6), 450–459.
- ⁷ Khan WI, Blennerhasset PA, Varghese AK et al. (2002): **Intestinal nematode infection ameliorates experimental colitis in mice**. Infect. Immun. 70(11), 5931–5937.
- ⁸ Liu Q, Sundar K, Mishra PK et al. (2009): **Helminth infection can reduce insulinitis and Type 1 diabetes through CD25- and IL-10-independent mechanisms**. Infect. Immun. 77(12), 5347–5358.
- ⁹ Freeman CM, Chiu BC, Stolberg VR et al. (2005): **CCR8 is expressed by antigen-elicited, IL-10-producing CD4+ CD25+ T cells, which regulate Th2-mediated granuloma formation in mice**. J. Immunol. 174(4), 1962–1970.
- ¹⁰ Ashour DS, Othman AA, Shareef MM, Gaballah HH, Mayah WW (2013): **Interactions between Trichinella spiralis infection and induced colitis in mice**. J. Helminthol. doi:10.1017/S0022149X13000059, 1–9.
- ¹¹ Cho MK, Park MK, Kang SA, Choi SH, Ahn SC, Yu HS (2012): **Trichinella spiralis infection suppressed gut inflammation with CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cell recruitment**. Korean J. Parasitol. 50(4), 385–390.
- ¹² Aranzamendi C, de Bruin A, Kuiper R et al. (2013): **Protection against allergic airway inflammation during the chronic and acute phases of Trichinella spiralis infection**. Clin. Exp. Allergy 43(1), 103–115.
- ¹⁴ Sewell D, Qing Z, Reinke E, Elliot D, Weinstock J, Sandor M, Fabry Z (2003): **Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by helminth ova immunization**; International Immunology; Vol. 15, No. 1, pp. 59±69.
- ¹⁵ Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, Nairn AC, Salter MW, Lombroso PJ, Gouras GK, Greengard P (2005): **Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta**. Nat Neurosci. 8:1051–8.
- ¹⁶ Torres L, Robinson SA, Kim DG, Yan A, Cleland TA, Byno MS (2018): **Toxoplasma gondii alters NMDAR signaling and induces signs of Alzheimer’s disease in wild-type, C57BL/6 mice.**, Journal of Neuroinflammation.
- ¹⁷ Gouy de Bellocq J, Ferte H, Depaquit J, Justine JL, Tillier A, Durette-Desset MC (2001) **Phylogeny of the Trichostrongylina (Nematoda) inferred from 28S rDNA sequences**. Mol Phylogenet Evol 19:430–442.

-
- ^{18 6} Cywińska A., Baś M., Schollenberger A., (2004) **Inwazja *Heligmosomoides polygyrus* u myszy – model w badaniach inwazji nicieni jelitowych.** Medycyna Wet. 60(7) 695-700.
- ¹⁹ Bryant V. (1973) **The life cycle of *Nematospiroides dubius*, Baylis 1926 (Nematoda: Heligmosomidae).** J Helminthol. 47(3). 263-268.
- ²¹ Maizels et al. (2012): **Immune modulation and modulators in *Heligmosomoides polygyrus* infection;** Experimental Parasitology 132: 76-89.
- ²² Valanparambil R.M., Segura M., Tam M., Jardim A., Geary TG, Stevenson M.M. (2014) **Production and analysis of immunomodulatory excretory-secretory products from the mouse gastrointestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus bakeri*.** Nat Protoc. 9(12): 2740–2754. doi: 10.1038/nprot..
- ²³ Donskow-Łysoniewska K, Krawczak K, Bocian K, Doligalska M (2017): **The effects of Intestinal nematode L4 stage on mouse experimental autoimmune encephalomyelitis.** Arch.Immunol.Ther.Exp.
- ²⁴ Rzepecka J., Lucius R., Doligalska M., Beck S., Rausch S., Hartmann S (2006).; **Screening for immunomodulatory proteins of the intestinal parasitic nematode *Heligmosomoides polygyrus*;** Parasite Immunology; 28, 463–472.
- ²⁵ Urbanowicz I , Nahaczewska W , Stacherzak-Pawlik J , Woźniak M (2013): **Starzenie się limfocytów i jego wpływ na rozwój przewlekłej białaczki limfocytowej;** Journal of Laboratory Diagnostics, Volume 49, Number 2, 137-144.
- ²⁶ Lages CS et al.: **Functional regulatory T cells accumulate in aged hosts**
Gruver AL., Hudson LL, Sempowski D: **Immunosenescence of ageing.**
- ²⁷ Ron-Harel N, Segev Y, Lewitus GM, Cardon M, Ziv Y, Netanel D, Jacob-Hirsch, Amariglio N, Rechavi G, Domany E, Schwartz (2008): **Age-Dependent spatial memory loss can be partially restored by immune activation.** Rejuvenation research II; 5, 903-913.
- ²⁸ Kren L, Brazdil J, Hermanova M, Goncharuk VN, Kallakury BV, Kaur P, Ross JS (2004) **Prognostic significance of anti-apoptosis proteins survivin and bcl-2 in non-small cell lung carcinomas: a clinicopathologic study of 102 cases.** Appl Immunohistochem Mol Morphol; 12: 44-9.
- ²⁹ Vischioni B, van der Valk P, Span SW, Kruij FA, Rodriguez JA, Giaccone, G. (2004): **Nuclear localization of survivin is a positive prognostic factor for survival advanced non-small-cell lung cancer.** Ann Oncol; 15: 1654-60.
- ³⁰ Caldas H, Honsey LE, Altura RA. **Survivin 2alpha: a novel Survivin splice variant expressed in human malignancies.** Mol Cancer 2005; 4: 11.
- ³¹ Li F, Ling X (2006): **Survivin study: an update of “what is the next wave”?** J Cell Physiol; 208: 476-86.
- ³² Meng H, Lu CD, Sun YL, Dai DJ, Lee SW, Tanigawa N (2004): **Expression level of wild-type survivin in gastric cancer is an independent predictor of survival.** World J Gastroenterol; 10: 3245-50.
- ³³ Okada H, Mak TW (2004): **Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells.** Nat Rev Cancer; 4: 592-603.
- ³⁴ Islam A, Kageyama H, Hashizume K, Kaneko Y, Nakagawara A (2000): **Role of survivin, whose gene is mapped to 17q25, in human neuroblastoma and identification of a novel dominant-negative isoform, survivin-beta/2B.** Med Pediatr Oncol; 35: 550-3.
- ³⁵ Dohi T, Beltrami E, Wall NR, Plescia J, Altieri DC (2004): **Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis.** J Clin Invest 2004; 14: 1117-27.

-
- ³⁶ Vischioni B, van der Valk P, Span SW, Krzyt FA, Rodriguez JA, Giaccone G (2004): **Nuclear localization of survivin is a positive prognostic factor for survival advanced non-small-cell lung cancer.** Ann Oncol; 15: 1654-60.
- ³⁷ Jakóbsiak M, Gołąb J, Zagożdżon R (2000): **Immunologia**; Warszawa; wyd. PWN; str. 276-278.
- ³⁸ Jakóbsiak M, Gołąb J, Zagożdżon R (2000): **Immunologia**; Warszawa; wyd. PWN; str. 280.
- ³⁹ Jakóbsiak M, Gołąb J, Zagożdżon R (2000): **Immunologia**; Warszawa; wyd. PWN; str 285-286.
- ⁴⁰ Liu L., Duff K. (2008); **A Technique for Serial Collection of Cerebrospinal Fluid from the Cisterna Magna in Mouse**; JoVE. 21. <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=960>, doi:10.3791/960
- ⁴¹ Wang YJ, Zhou HD et al. (2006): **Clearance of amyloid-beta in Alzheimer's disease: progress, problems and perspectives.** Drug Discov Today; 11: 931.938.
- ⁴² Bruunsgaard H., Pedersen M. et al. (2001): **Aging and proinflammatory cytokines.** Curr Opin Hematol; 8: 131.136.
- ⁴³ Shibata M., Yamada S. et al. (2000): **Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier.** J Clin Invest; 106: 1489.1499.
- ⁴⁴ Yan SD, Zhu H et al. (2000): **Receptor-dependent cell stress and amyloid accumulation in systemic amyloidosis.** Nat Med; 6: 643.651.
- ⁴⁵ Zlokovic BV, Martel CL et al. (1996): **Glycoprotein 330/megalin: probable role in receptor-mediated transport of apolipoprotein J alone and in a complex with Alzheimer disease amyloid beta at the bloodbrain and blood-cerebrospinal fluid barriers.** Proc Natl Acad Sci USA; 93: 4229.4234.
- ⁴⁶ Lim G. P., Yang F., Chu T., Chen P., Beech W., Teter B., Tran T., Ubeda O., Hsiao Ashe K., Frautschy S. A., Cole G. M (2000): **Ibuprofen Suppresses Plaque Pathology and Inflammation in a Mouse Model for Alzheimer's Disease.** The Journal of Neuroscience; August 1, 20(15):5709–5714.
- ⁴⁷ Centers for Disease Control and Prevention (2015): **Pertussis Chapter - Epidemiology of Vaccine-Preventable Diseases**; The Pink Book: Course Textbook.
- ⁴⁸ Bogdanowicz J. (1954): **Krztusiec**; Warszawa; Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich.
- ⁴⁹ De Gouw D., Diavatopoulos D.A., Bootsma H.J., Hermans P.W., Mooi F.R (2011): **Pertussis: a matter of immune modulation.** FEMS Microbiol. Rev., 35: 441-474.
- ⁵⁰ Smith A.M., Guzmán C.A., Walker M.J (2001): **The virulence factors of Bordetella pertussis: a matter of control.** FEMS Microbiol. Rev., 25: 309-333.
- ⁵¹ Flak T.A., Goldman W.E (1999): **Signalling and cellular specificity of airway nitric oxide production in pertussis.** Cell. Microbiol., 1: 51-60.
- ⁵² Wynn TA, Chawla A, Pollard jw. (2013): **Macrophage biology in development, homeostasis and disease.** Nature; 496(7446):445-55.
- ⁵³ Liu G, Yang H. (2013): **Modulation of macrophage activation and programming in immunity.**, J Cell Physiol.; 228(3):502-12.
- ⁵⁴ Chapel H., Haeney M., Misbah S., Snowden N. (2009): **Immunologia kliniczna**, Lublin, wyd. Czelej, 16,17.
- ⁵⁵ Liu Y., Zou X., Chai Y., Yao Y. (2014): **Macrophage polarization in inflammatory diseases.** Int. J. Biol. Sci.; 10: 520–530.

-
- ⁵⁶ Paulson JC (2007): **Innate immune response triggers lupus-like autoimmune disease.** *Cell.*;130(4):589–591.
- ⁵⁷ Abramson SL, Gallin JI (1990): **IL-4 inhibits superoxide production by human mononuclear phagocytes.** *The Journal of immunology*;144:625–30.
- ⁵⁸ Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S (1992): **Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation.** *The Journal of experimental medicine*;176:287–92.
- ⁵⁹ Mosser DM, Edwards JP (2008): **Exploring the full spectrum of macrophage activation.** *Nature reviews immunology*;8:958–69. doi:10.1038/nri2448.
- ⁶⁰ Gordon S, Martinez FO (2010): **Alternative activation of macrophages: mechanism and functions.** *Immunity*;32:593–604. doi:10.1016/j.immuni.2010.05.007.
- ⁶¹ Noel W, Raes G, Hassanzadeh Ghassabeh G, De Baetselier P, Beschin A (2004): **Alternatively activated macrophages during parasite infections.** *Trends Parasitol*;20(3):126–133.
- ⁶² Babu S, Blauvelt CP, Kumaraswami V, Nutman TB (2005): **Chemokine receptors of T cells and of B cells in lymphatic filarial infection: a role for CCR9 in pathogenesis.** *J Infect Dis*;191(6):1018–1026.
- ⁶³ Mylonas KJ, Nair MG, Prieto-Lafuente L, Paape D, Allen JE (2009): **Alternatively activated macrophages elicited by helminth infection can be reprogrammed to enable microbial killing.** *The Journal of immunology*;182:3084–94. doi:10.4049/jimmunol.0803463.
- ⁶⁴ Wynn TA, Chawla A, Pollard JW: **Macrophage biology in development, homeostasis and disease.** doi:10.1038/nature12034.
- ⁶⁵ Donskow-Łysoniewska K, Krawczak K, Bocian K, Doligalska M (2018): **The Effects of Intestinal Nematode L4 Stage on Mouse Experimental Autoimmune Encephalomyelitis;** *Arch. Immunol. Ther. Exp.*; 66:231–243.
- ⁶⁶ Martinez FO, Gordon S (2014): **The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment.** *F1000Prime Reports*; 6:1-13.
- ⁶⁷ Gundra UM, Girgis NM, Ruckerl D i wsp. (2014): **Alternatively activated macrophages derived from monocytes and tissue macrophages are phenotypically distinct.** *Blood*; 123: 110-122.
- ⁶⁸ McWhorter FY, Wang T, Nguyen P, Chung T, Liu WF (2013): **Modulation of macrophage phenotype by cell shape.** *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*; 110: 17253-17258.
- ⁶⁹ Noy R, Pollard JW (2014): **Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy.** *Immunity*; 41: 49-61.
- ⁷⁰ Fernandez-Velasco M, Gonzales-Ramos S, Bosca L (2014): **Involvement of monocytes/macrophages as key factor in the development and progression of cardiovascular diseases.** *Biochem. J.*; 458: 187-193.
- ⁷¹ Vogel D, Heijnen D, Breur M i wsp. (2014): **Macrophages migrate in an activation-dependent manner to chemokines involved in Neuroinflammation.** *J.Neuroinflam.*; 11: 23-31.